تقييم فعالية مستخلص الورد الماوي المائي و الكحولي على تثبيط نمو البكتريا المرضية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من حالات التهاب البلعوم و اللوزتين

حنان عدنان النعيمي
معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية

امنة نعمة الثويني
معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية

فريد جميل الطحان
فرع الفسلجة والادوية
كلية الطب البيطري- جامعة بغداد

الخلاصه

درس تاثير المستخلص النباتي للورد الماوي على تثبيط نمو البكتريا المعزولة من التهاب البلعوم و اللوزتين بعد تحضير المستخلص بطريقتي الاستخلاص الكحولي والمائي الحار بالاضافه الى استخدام مسحوقه الجاف , و تم الكشف عن مكوناته الكيميائيه إذ احتوى الورد الماوي بشكله الجاف و مستخلصه المائي و الكحولي على الراتنجات , التانينات ,الكلايكوسيدات, الصابونينات, الفينولات ,الفلافونات ووجدت القلويدات بنسبه قليله في مستخلصه المائي و الكحولي . وكان تاثير المستخلص الكحولي افضل من المائي على تثبيط نمو البكتريا و خاصة بكتريا
Streptococcus salivarius اذ وصل قطر التثبيط 27.0 ملمتر .

تم في هذه الدراسه ايضا تحديد قيمه التركيز المثبط الادنى MIC و قيمه التركيز القاتل الادنى MBC للمستخلصات النباتيه على البكتريا الموجبه لصبغة كرام الاكثر تواجدا و قد تباينت النتائج تبعا لاختلاف نوع المستخلص و نوع البكتريا حيث ان اقل قيمه MIC وMBCكانت لمستخلص الورد الماوي الكحولي على نمو بكتريا *Staph.epidermidis* اذ وصلت الى 10, 20 % على التوالي.

لوحظ ان للمستخلص النباتي المائي للورد الماوي تأثيرا مهدئا عند اعطائه بجرعة 5 غرام /كيلو غرام , كما أظهر هذا المستخلص فعلا مهدئا تازريا عند مزجه مع عقار البنتوباربيتون مما أدى إلى إطالة مدة النوم للفئران المختبريه . ولم يكن للمستخلصات النباتية المائية والكحولية أي أثار سميه لدى الفئران المختبريه المجرعة عن طريق الفم بجرعة من 2.5–15 غرام / كيلو غرام من وزن الجسم.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATERY AND ALCOHOLIC EXTRACTS FOR *ANCHUSA STRIGOSA* ON GROWTH OF GRAM POSITIVE PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM PHARYNGITIS AND TONSILLITS CASES

HANAN A. AL-AYMI
genetic engineering and biotechnology
Baghdad university

AMINA N. AL-THAWANI
genetic engineering and biotechnology
Baghdad university

FARID J. AL-TAHAN
Dept. of Physiology &Pharmacology -College of Vet. Med. – Baghdad University

SUMMARY

The effects of *Anchusa strigosa* plant extract were studied in respect to their of gram positive bacterial growth inhibition. were isolated from cases of pharyngitis and tonsillitis . alcoholic and hot water extracts of the plants as well as their dried powders were prepared . The preliminary chemical tests revealed acidic pH of all extracts.

The dried powder , watery and alcoholic extracts of *A. strigosa* contained resins ,tannins , phenols, flavonoids, glycosides and avery little amount of alkaloids in its watery and alcoholic extract.The alcoholic extract of *A. strigosa* showed more patent inhibitory effect on resistant bacteria than its watery extract and the best effect was on growth of *Strept.salivarius* and *Strept.pyogenes* inhibition zone diameter 27.0,26.0 mm. In the present study , the Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bacteriocidal concentration (MBC) of the plants extracts were measured for the more predominant gram positive isolates and the results varied according to different kinds of plant extracts and different types of bacteria . The least values of MIC and MBC were for alcoholic extract of *A. strigosa* on *Staph.epidermidis* which valued 10% ,20% respectively .It has been noticed that the watery extracts of *A. strigosa* , have a sedative effect when given dosing 5 g/kg for laboratory mice , these extracts however, showed a synergistic sedative effect when mixed with pentobarbitone and caused prolongation of sleeping time in experimental mice .Neither the alcoholic nor the watery extracts of the plants showed any toxic effect on the laboratory mice after oral dosing of 2.5 – 15 g /Kg B.W. Watery and alcoholic extracts**,** *Anchusa strigosa* , Pharyngitis ,Tonsillitis . Pathogenic bacteria

المقدمة

استخدمت في الطب الشعبي نباتات كثيرة لعلاج اغلب الحالات المرضيه ومنها اصابات الجهاز التنفسي لامتلاكها مواد فعاله وسلامتها طبيا وسهولة الحصول عليها ومن هذه النباتات الورد الماوي وهي عشبه معمرة يصل أرتفاعها 30–60 سنتمتر ، وأعلاها يوجد عنقود زهري، الأوراق مسننة الحاشيه أو جميعها مسننة، التويج على شكل أنبوب واسع الفوهة وأزهارها ذات لون بنفسجي مزرق غنية بالرحيق العسلي والأجزاء المستعمله هي الأزهار والأوراق، تجمع خلال المدة من حزيران إلى تموز و تجفف بحذر شديد. أما جذوره فتستعمل لأخراج صباغ أحمر كانت النسوة قديماً يستخدمنها للتجميل ، ومن هنا جاءت تسميته Anchusa وباليوناني Ankousa وتعني الحمرة (1 ,2). ساقه مزغب بين خضرة وصفرة كرجل الجراد وأصول فروعه دقاق بيض (3) ولذلك قال عنه أبن البيطار يشبه في شكله السن البقر (4). ينتشر النبات في أوربا وأفريقيا واسيا ، وسجلت سبعة أنواع من هذه العائلة في العراق وهي:– A. aegyptiaca ، A. aucheri ، A. italica ، A. strigosa ، A. neglecta ، A. orientalis ، A. hispida تنتشر زراعته في كركوك ، الموصل ، جبل حمرين ، خانقين ، بدرة ، وادي حوران ، سنجار ، طوزخورماتو ، الصحراء الغربيه، طوز ، قرة داغ ، شمال الجزيره ، عماديه وراوندوز (5,1).

أشار (6) أنه يحتوي على : تانين , مواد هلاميه , قلويد البايرولزيدين (Pyrrolizidin alkaloid) , صابوندين (Supenden) و لايكوبسامين (Lycopsamine) . بالإضافة إلى هذه المكونات فلقد أشار (7) أنه يحتوي على Acetyl intermedine, Acety lycopsamine, Thesinine,Supinine and Ammabilin .

واكد(8) على أن عناصره الفعاله هي مادة غرويه، راتنج ، تانين ، صابونين ونترات البوتاسيوم.

واستخدم نبات الورد الماوي في علاج النزلات الشعبيه و الزكام و سمي بابو العرق فهو معرق ومدر للبول، ويعطى منقوعه للأطفال في النزلات الصدرية المصحوبة بسعال عنيف. وقال عنه أبن زكريا القزويني كاوزبان معناه لسان الثور، خاصية التفريح وإزالة الغم(4).

يستعمل مثل الشاي مقوي للأشخاص والأطفال يقلل النبض و ضغط الدم والأرهاق (6). هدف البحث الى تحضير المستخلص النباتي للورد الماوي بطريقتي الاستخلاص المائي والكحولي بالاضافه الى استخدامها كمسحوق جاف والكشف عن مركباتها الكيميائية الاساسية و دراسة تأثير هذه المستخلصات على نمو البكتيريا المعزوله من حالات التهاب البلعوم و اللوزتين وقياس التركيزالمثبط الأدنى (MIC)(Minimum inhibitory concentration) والتركيز القاتل الأدنى (MBC)(Minimum bacteriocidal concentration) لها كذلك التعرف على التأثير المهدئ (Sedative)

للمستخلص النباتي ومقارنته مع تأثير عقار البنتوباربيتون (Pentobarbitone) ثم تحديد الجرعة المميته الوسطيه (LD50) للمستخلص النباتي باستخدام الفئران المختبريه .

المواد و طرائق العمل

جمع العينات:-

تم جمع 175 عينة من المرضى المصابين بالتهاب البلعوم واللوزتين من مستشفى الكاظميه التعليمي و مستشفى الكرامه التعليمي و مستشفى الطفل المركزي و مستشفى الجراحات التخصصية والمختبرات التعليميه التابعه لمدينه الطب في بغداد من كانون الثاني 2003 إلى كانون الاول 2003 وبواقع 97 حالة ذكور و78 حالة إناث تراوحت اعمارهم من 4-50 سنة و ذلك بمسح المنطقه بماسحة قطنية (Cotton swab)معقمة و توضع المسحه في انابيب حاويه على الوسط الغذائي Nutrient broth .

عزل و تشخيص البكتريا :-

نقلت المسحات إلى المختبر وزرعت مباشرة بتمريرها على سطح الوسط المغذي ووسط الماكونكي الصلب ثم حضنت الأطباق بدرجة حراره 37 مئوي و بمعدل مكررين أحدهما يحضن بظروف هوائية والأخر بوجود 5%غاز ثنائي أوكسيد الكاربون ولمدة 24-48ساعة .ثم نقيت على أوساط زرعية اختيارية تفريقية وهي وسط الدم الصلب المضاف اليه أزايد الصوديوم و وسط بيكرز و وسط المانيتول ووسط الدم المسخن وحضنت بدرجة حراره 37 مئوي ولمدة 24 ساعة كذلك تم زرعها على المستنبت السائل .و تم اتباع خطوات التشخيص حسب طريقة (10, 9) ذلك اعتمادا على الصفات المزرعية و الفحص المجهري و الاختبارات الكيموحيويه التالية :-

1- اختبار قابلية البكتريا على الحركة (Motility test): -

تم طعن وسط المغذي شبه الصلب من المزروع البكتيري بعمر (18-24) ساعة بواسطة الإبرة الناقله وحصنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوي . انتشار النمو بشكل هاله حول خط الطعن دلالة على إيجابية الفحص.

2- اختبار إنتاج أنزيم الكاتاليز (Catalase production test): -

نقلت مستعمره او اكثر بواسطة اعواد خشبيه معقمه من مزروع بكتيري إلى شريحه زجاجيه عليها قطره واحده أو قطرتان من H_2O_2 (3%) ، ظهور الفقاعات يدل على إيجابية الفحص.

3- اختبار إنتاج أنزيم التجلط (Coagulase productin test) :-

أجري الفحص بطريقتين:-

A- طريقة الشريحه الزجاجيه (Slide coagulase):-

أضيفت قطره من محلول الملح الفسلجي على شريحه زجاجيه وفرشت بها مستعمره من النمو البكتيري بعمر 18 ساعه ثم اضيفت اليها قطره من بلازما الأرنب ومزجت مع المستعمره البكتيريه ، ظهور التخثر بعد 5-10 ثواني دليل على ايجابية الفحص .

B- طريقة الأنابيب (Tube coagulase)

أضيف 0.1 مللتر من العالق البكتيري بعمر 18ساعة في أنبوبة اختبار تحوي 0.4 مللتر من بلازما الأرنب وحضنت الأنابيب بدرجة حراره 37 مئوي وتمت مراقبة حدوث التخثر كل ساعة لمدة 4ساعات ، أن وجود إي أثر للتخثر يدل على إيجابية الفحص في حين استمر حضن الأنابيب التي لم تعطي نتيجة ايجابيه لمدة 6-24 ساعة قبل عدّ النتيجه النهائيه سالبه ، قورنت النتائج مع أنبوبة السيطره الحاويه على المحلول الفسلجي والعالق البكتيري فقط .

4- اختبار فعالية انزيم محلل الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين Deoxyribonuclease activity test (DNase)

استخدم وسط DNase الصلب، وتم تلقيح الوسط بالبكتريا بطريقة الطعن ، و حضن الاطباق في درجة حراره 37 مئوي لمدة 18-24 ساعه بعد ذلك يضاف حامض الهيدروكلوريك (1N) HClإلى الطبق ، ظهور منطقة شفافه أو صافيه حول المستعمرات الناميه يعد نتيجه موجبه.

5- اختبار انتاج أنزيم الفوسفاتيزالقاعدي (Alkaline phosphtase production test)

زرع وسط الفينولفثالين (Phenolphthalein) الصلب بالطعن ثم حضنت الأطباق بدرجة حراره 37 مئوي لمدة 18-24 ساعه بعد ذلك توضع ورقة ترشيح مبلله بمحلول الامونيا المركز في غطاء الطبق ، ظهور اللون الاحمر – وردي براق دليل على ايجابية الاختبار .

6- اختبار تخمر ملح المانيتول (Mannitol salt fermentation):-

يعد هذا الوسط وسط انتقائي يحتوي على 1%مانتول و 7.5% كلوريد الصوديوم والفينول الأحمر كدليل لإنتاج الحامض، زرعت البكتريا على الوسط وحضنت بدرجة حراره 37 مئوي لمدة 24 ساعة عند تحول لون المستعمرة والوسط المحيط بها إلى اللون الأصفر يعد نتيجة موجبه للاختبار .

7- اختبار انتاج أنزيم اليوريز (Urease production test):-

لقحت الأنابيب الحاويه على وسط اليوريا المتكون من اليوريا وكاشف الفينول الأحمر وبشكل مائل بالعزلات البكتيريه وحضنت بدرجة حراره 37 مئوي لمدة 24 ساعة ، عدت النتيجه موجبه بتحول لون الوسط إلى الوردي الغامق البراق.

8- **اختبار إنتاج أنزيم الاوكسيديز (Oxidase production test) :-**

تم الاختبار بنقل جزء من النمو البكتيري بواسطة ناقل خشبي (stick) إلى ورقة ترشيح مضافه اليها بضع قطرات من المادة Tetramethyle-P-Phenylendiamine dihydrochloride . ويراقب مباشرة تغير لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي الغامق في الحالة الموجبة والذي يجب أن يظهر خلال 20-30ثانيه .

9- **اختبار قابلية الذوبان بأملاح الصفراء (Bile solubility test) :-**

أخذ نمو بكتيري 1-2مستعمرة ووضع في أنبوبه زجاجيه معقمه حاويه على 2 مللتر من محلول الملح الفسيولوجي المعقم ثم وزعت في أنبوبتين زجاجيتين معقمتين 1 مللتر لكل أنبوبة، أضيف للأنبوبه الأولى قطرتان من محلول أملاح الصفراء 10% في حين أضيف للأنبوبه الثانيه (أنبوبة السيطره) قطرتان ماء مقطر معقم، حضنت لمدة 10-15 دقيقه، عندما تكون النتيجه موجبه يلاحظ اختفاء الخلايا في أنبوبه الاختبار مقارنة مع أنبوبة السيطرة.

10- **اختبار حساسية البكتريا للمضاد الحيوي الباسيتراسين**(Bacitracin senstivity test) :-

زرعت البكتريا على وسط الدم الصلب الحاوي على (7-10) % دم الإنسان، ووضع قرص الباسيتراسين (0.04 I.U) في وسط الطبق وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوي لمدة 24 ساعه وبوجود 5 -10% غاز ثنائي اوكسيد الكاربون إيجابية الفحص تقرأ بظهور منطقة تثبيط حول القرص بقطر اكثر من 14 ملمتر .

11 - **اختبار حساسية البكتريا للمضاد الحيوي الاوبتوكين** .(ptochinsensitivity test):-

زرعت البكتريا على وسط الدم الصلب الحاوي على(7 -10)% دم الإنسان وثبت قرص الاوبتوكين وسط الطبق ، حضن بدرجة حراره 37 مئوي لمدة 24 ساعة وبوجود غاز ثنائي أوكسيد الكاربون بتركيز 5 -10 % إيجابية الفحص تقرأ بظهور منطقة تثبيط حول القرص.

12 - اختبار تخمر السكريات (Sugar fermentation test):-

لقحت المستعمرات المعزوله النقيه و الناميه بعمر 24 ساعه على الوسط الاساس المضاف له السكريات كل على انفراد بنسبة 1% لكل سكر . عدم تغيير لون الوسط خلال مدة الحضن 18- 24ساعه دليل على عدم قدرة البكتريا على تخمر السكريات.

13- **اختبار_القابليه على النمو في الاوساط القاعديه** (9.6،4 ,7):-

زرعت البكتريا في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) بعد أن عدل الرقم الهيدروجيني له إلى 9.6 و7.4 , حضنت بدرجة حراره 37 مئوي لمدة 24-48 ساعة و عد نموها نتيجه موجبه .

14- **اختبار القابلية على النمو بدرجات حرارية مختلفة :-**

زرعت البكتريا على وسط الدم الصلب وحضنت بدرجات حرارية مختلفة (10، 37 ، 45 مئوي) لمدة 24- 48 ساعة و عد نموها نتيجه موجبه .

طرائق التشخيص باستعمال العدد التشخيصيه الجاهزة :-

1-اختبار لانسفيلد للمجاميع (Lancefield grouping test) :-

استعمل في هذا الفحص عدة Streptococcal latex agglutinationوفكرة هذا الاختبار تعتمد على امكانية حدوث تفاعل نوعي بين المستضدات المستخلصة من بكتريا المكورات السبحيه مع الاضداد الخاصة بها و اتبعت تعليمات الشركة المصنعة شركة باستروكس الفرنسيه.

2-فحص API 20 Strepو فحص API Staph:-

يتألف هذا النظام من شريط حاوي على ركائز فحص مجففه في أنابيب دقيقه مفرده حيث يعاد تعليقها من خلال إضافة كميه مناسبه من وسط نظام التشخيص الذي سبق وان لقح بالبكتريا المراد دراستها بعد حضن الشريط بدرجة حرارة 37 مئوي تضاف الكواشف ثم تقرأ النتائج بالاعتماد على (Analytical profile Index Strep)ليتسنى لنا معرفة هوية العزله البكتيرية.

جمع العينات النباتيه:-

تم الحصول على كمية من نبات الورد الماوي من المعاشب الموجوده في الاسواق المحلية في بغداد . أرسل النبات الى المعشب الوطني التابع لمديرية النبات في وزارة الزراعة في أبي غريب لغرض تشخيص جنسه. طحن النبات بواسطة مطحنه كهربائيه (Morter), حفظ المسحوق في أكياس بلاستيكيه نظيفه وبدرجه حراره الغرفه لحين الاستعمال

--تحضير المستخلص النباتي :-

1- تم استخلاص النبات بطريقتين :-

A - الاستخلاص المائي الحار و حسب طريقة (11)

B - الاستخلاص الكحولي الحار و حسب طريقة (12)

بعد الحصول على المستخلص بسحب الكحول منه تماما باستعمال جهاز المبخر الدوار تم تقدير رقمه الهيدروجيني .(pH Reaction)(7)تم الكشف الكيميائي عن بعض المكونات الاساسيه في المسحوق الجاف و المستخلصين المائي و الكحولي للنبات و التي تركزت على الكلايكوسيدات ، التانينات ، الفينولات ، الصابونينات ، الراتنجات، القلويدات ، الكومارينات و الفلافونات حسب ما جاء عن(12و13).

تحضير التراكيز القياسية للمستخلصات النباتية الخام :-

حضرت التراكيز النهائية للمستخلص المائي و الكحولي الخام لنبات الورد الماوي باستخدم الماء المقطر المعقم , وكانت بمقدار 10 ، 20 ،30 ،40، 50، 60 ،70 و 80%.

دراسه تأثير المستخلصات النباتية على نمو البكتريا :-

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر (The agar well diffusion method) لملاحظة تأثير المستخلص النباتي على نمو البكتريا المعزوله قيد الدراسه . لقح وسط مولر هنتون الصلب (المضاف إليه الدم حسب الحاجه) بواسطة قطنه معقمه من العالق البكتيري الحاوي على 1.5 10^8x خلية /مللتر . عملت حفرعلى سطح الوسط الزرعي المزروع بواسطة الثاقب الفليني (Cork borrer) ووضعت التراكيز المحضره لكل مستخلص بمقدار 0.1 مللتر لكل حفرة ،مع وضع قرص مضاد الحيوي القياسي السيبروفلاكساسين المستخدم في الدراسه لكل طبق كسيطره وكذلك استخدم الماء المقطر للسيطره (بالتبادل مع قرص المضاد الحيوي و ذلك لعدم كفاية سطح الطبق لوجودهما معا) للتأكد بأن ليس له تأثير تثبيطي على نمو البكتريا وتركت الأطباق في درجة حرارة الغرفه لمدة 20 دقيقة ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حراره 37 مئوي لمدة 24 ساعة وبمعدل ثلاث مكررات لكل عزلة حددت فعاليه المستخلص بقياس قطر منطقة التثبيط حول كل حفره بالملمتر , و تم حساب المعدل للمكررات الثلاثه (14) .

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)و التركيز القاتل الادنى(MBC) للمستخلص النباتي ضد البكتريا المعزولة وفقا للطريقة الموصوفه من قبل(15),Atlas *et al*. .

دراسة التأثيرات المهدئه للمستخلص النباتي المائي والكحولي لنبات الورد الماوي:-

أجريت هذه التجربة حسب ما ذكرت (16) على الفئران من نوع Webster albino swiss mice عدد 24 فارا تراوحت اوزانها بين 28.6-34.7 غرام و بمعدل (31.65) غرام , قسمت عشوائيا الى 6 مجموعه تضم كل مجموعه 4 فئران .حقنت احدى المجموعات بعقار البنتوباربيتون في التجويف البريتوني (Intra peritoneal) بجرعه 35 ملغرام / كيلوغرام من وزن الجسم و بكمية من المحلول قدرها 0.1 مللتر لكل 10 غرام من وزن الجسم ثم حسبت مدة النوم بتاثير البنتوباربيتون للحيوانات بالدقائق جرعت مجموعة اخرى بالماء المقطر فقط و تركت المجموعتان كسيطرة . و جرعت مجموعتان من الحيوانات كل واحدة منها بجرعة 5 غرام/كيلوغرام من وزن الجسم و بكميه 0.1 مللتر / 10 غرام من وزن الجسم لكل من المستخلص المائي او الكحولي للورد الماوي عن طريق الفم , و حسبت مدة النوم في كل مجموعة بالدقائق . كررت التجربه على نفس العدد من الحيوانات و بنفس الطريقه مع استخدام المستخلص النباتي بعد ساعة من حقن الحيوانات بعقار البنتوباربيتون لمعرفة

امكانية وجود فعل تازري بين المستخلص النباتي و عقار البنتوباربيتون و حسبت مدة النوم و قورنت النتائج مع بعضها .

دراسة التأثيرات السمية للمستخلصات النباتية المائية و الكحولية

تعيين الجرعة المميتة الوسطية LD50 في الفئران عن طريق الفم:

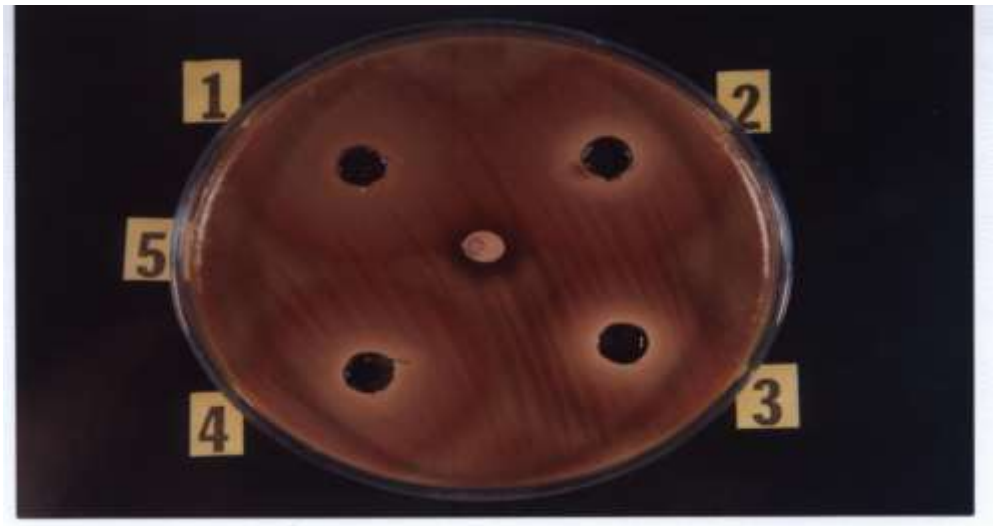
استخدم في هذه الدراسه 52 فارا من نفس النوع السابق تراوحت اوزانها بين 28.6 – 34.7 غرام و بمعدل 31.65 غرام لدراسة الجرعه المميته الوسطيه للمستخلص المائي و الكحولي للورد الماوي .حيث قسمت هذه الفئران عشوائيا الى 13 مجموعه و تضم كل مجموعه 4 فئران . و أعطي بجرع متدرجة هي 2.5 , 5, 7.5, 10 , 12.5 و 15 غرام /كيلوغرام من وزن الجسم و ذوبت بكميه من الماء المقطر بمقدار 0.1 مللتر /10غرام من وزن الجسم و جرعت مجموعه بالماء المقطر لوحده و عدت بوصفها مجموعة سيطرة 17 تمت مراقبة الحيوانات خلال 24 ساعة و اجريت الصفه التشريحية للحيوانات من كل مجموعه للتأكد من عدم وجود افات عيانية و نزفيه تدل على السمية .

النتائج

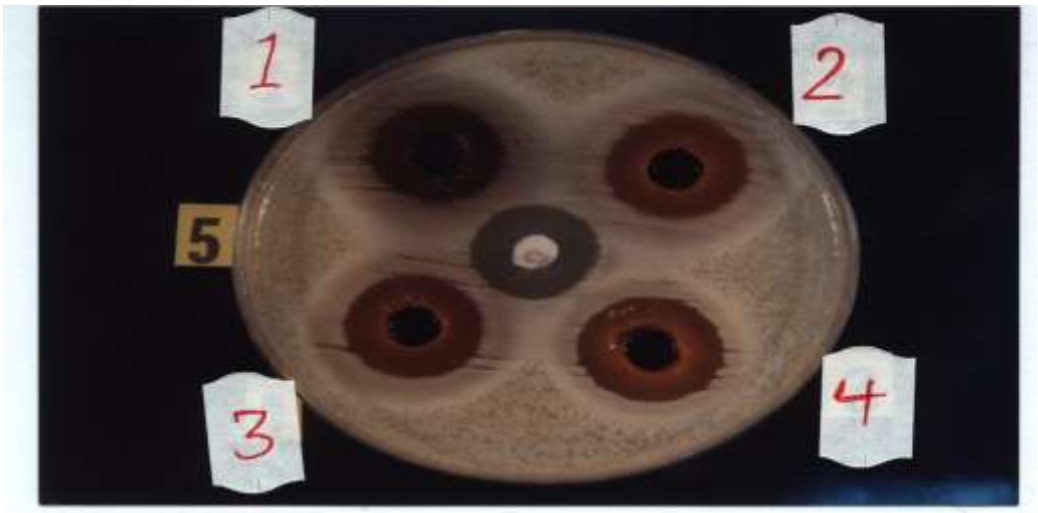
الدراسةالفيزيائيه و الكيميائية :- تلون مستخلص الورد الماوي باللون البنفسجي الغامق وعند الخزن وتعرضه للهواء والضوء تحول إلى لون مائل للاسوداد و ذو طعم حلو و مستساغ جدا ، وبلغت نسبة وزن المستخلص المائي للورد الماوي إلى وزنه الجافة 35.3% , بينما كانت نسبة وزن مستخلصه الكحولي 40.3%. كما اثبت الكشف الكيميائي أن المسحوق الجاف لنبات الورد الماوي و مستخلصه المائي و الكحولي المركز يحتوي على الراتنجات ,التانينات ,الكلايكوسيدات , الصابونينات , الفينولات , الفلافونات و كميه قليله من القلويدات في مستخلصه المائي و الكحولي اما الكومارينات فلم يثبت وجودها و كان الرقم الهيدروجيني لمسحوقه ومستخلصه المائي و الكحولي 6.69 , 6.41 , 5.59 .

تأثير المستخلص و مساحيق النبات على نمو البكتريا المعزولة:-

تم دراسة تاثير استخدام المسحوق الجاف و المستخلصين المائي و الكحولي للورد الماوي على البكتريا الموجبة لصبغة كرام المعزولة من التهاب البلعوم و اللوزتين و لم يلاحظ أي تاثير تثبيطي يذكر عند استخدام المسحوق الجاف للورد الماوي على نمو البكتريا قيد الدراسه التابعة لجنس Streptococcus spp. , Staphylococcus spp. , Micrococcus spp. بينما كان لمستخلصات هذا النبات نتائج ايجابيه في تثبيط نمو هذه البكتريا كما موضح في الشكل(1و2)والجدول (1و2)



الشكل (1): الاقطار التثبيطيه لمستخلص الورد الماوي الكحولي على نمو بكتريا *Sterpt.pyogen*



الشكل (2):الاقطار التثبيطيه لمستخلص الورد الماوي الكحولي على نمو بكتريا *Staph.aureus*

جدول (1):اقطار تثبيط نمو البكتريا العائده لجنس *Streptococcus , Staphylococcus* و *Micrococcus* بتاثير المستخلص المائي لنبات الورد الماوي مقاسه بالمليمترات .

ت	العزلات البكتيرية	تركيز المستخلص المائي للورد الماوي / معدل اقطار التثبيط مقاسه بالمليمترات و قيمة الخطا القياسي .							
		%10	%20	%30	%40	% 50	%60	%70	%80
.1	*Sterpt.pyogenes*	15.0 ± 1.1	15.6 ± 0.9	16.0 ± 0.5	16.0 ± 0.5	18.0 ± 1.0	18.0 ± 1.0	19.0 ± 0.5	19.0 ± 0.3
.2	*Sterpt.pneumoniae*	11.0 ± 0.5	12.0 ± 0	12.6 ± 0.5	13.0 ± 0.5	13.0 ± 0.4	14.0 ± 0.5	15.0 ± 0.5	17.6 ± 0.5
.3	*Strept.salivarius*	15.0 ± 0.5	15.0 ± 0.5	15.3 ± 0.4	16.0 ± 0.05	16.0 ± 0	16.0 ± 0.5	17.0 ± 0.05	17.3 ± 0.5
.4	*Staph.aureus*	-	11.0 ± 0.05	13.0 ± 0.3	14.3 ± 0.5	16.0 ± 0.05	17.6 ± 0.5	19.0 ± 0.9	20.0 ± 0.5
.5	*Staph.epidermidis*	-	11.0 ± 0.05	12.0 ± 0.5	13.6 ± 0.6	15.0 ± 0.5	16.0 ± 0.5	16.0 ± 0.3	17.3 ± 0.2
.6	*Staph. haemolyticus*	-	-	-	-	11.6 ± 0.05	12.0 ± 0.5	14.0 ± 0.5	15.0 ± 0.5
.7	*Staph.capitis*	13.0 ± 1.2	15.0 ± 1.3	17.0 ± 0.8	18.0 ± 0.05	18.6 ± 0.6	20.0 ± 0.05	20.0 ± 0	20.0 ± 0.5
.8	*Staph. hominis*	12.6 ± 0.3	15.0 ± 0.2	16.0 ± 0.5	16.0 ± 0.5	18.0 ± 0.3	18.3 ± 0.5	19.0 ± 0.5	20.0 ± 0.5
.9	*Micrococcus spp.*	-	12.3 ± 0.5	13.0 ± 0.6	13.6 ± 0.6	16.0 ± 0.5	16.0 ± 0.5	16.3 ± 0	16.3 ± 0.05

% النسبه المئويه . ± قيمة الخطا القياسي .

جدول (2):اقطار تثبيط نمو البكتريا العائده لجنس *Streptococcus , Staphylococcus* و *Micrococcus* بتاثير المستخلص الكحولي لنبات الورد الماوي مقاسه بالمليمترات .

ت	العزلات البكتيرية	تركيز المستخلص الكحولي للورد الماوي / معدل اقطار التثبيط مقاسه بالمليمترات و قيمة الخطا القياسي .							
		%10	%20	%30	%40	%50	%60	%70	%80
.1	*Strept .pyogenes*	1.1±17.0	±18.0 1.1	19.0 0.4±	21.0 0.05±	±22.6 0.3	±22.6 0.3	±25.0 0.5	±26.0 0.05
.2	*Sterpt. Pneumoniae*	1.2±13.3	±14.0 0.5	±16.0 0.5	±19.6 0.6	±21.0 0	21.3 0.05±	±23.0 0	0.5±24.0
.3	*Strept. salivarius*	0.5±20.0	±20.0 0.5	±22.6 0.9	24.0 0.05±	±25.0 0.5	±25.0 0.5	±27.0 0	0.5±27.0
.4	*Staph. aureus*	0.8±12.3	±15.0 0.5	±15.6 0.4	16.0 0.5±	±17.6 0.3	18.0 0.05±	±20.0 0.5	21.0 0.05±
.5	*Staph. epidermidis*	14.0 0.05±	±15.0 0.5	±17.6 0.3	18.0 0.05±	±19.0 0.5	±19.0 0.5	±19.6 0.6	0.6±19.6
.6	*Staph. haemolyticus*	0.8±13.6	±14.0 0.5	±15.0 0.5	±15.0 0.5	±16.0 0.4	±16.0 0.05	±18.0 0.5	0.5±18.0
.7	*Staph.capitis*	1.5±13.3	±15.5 0.9	±16.6 0	±18.3 1.3	±20.0 0	±20.0 1.6	±22.0 1.0	±22.0 0
.8	*Staph. hominis*	1.5±12.0	±12.6 0.5	±14.0 0.5	±15.0 1.0	±16.0 0.6	±18.0 1.0	±19.6 0.4	0.5±22.0
.9	*Micrococcus spp.*	1.5±12.0	±12.0 1.0	±12.6 1.2	±14.6 0.8	±16.6 0.3	±17.3 0.8	±20.0 0.5	1.0±20.0

% النسبه المئويه . ± قيمة الخطا القياسي .

-التركيز المثبط الادنى Minimum Inhibitory concentration (MIC) و التركيز القاتل الأدنى Minimum Bacteriocidal concentration (MBC) للمستخلص النباتي.

تؤكد النتائج أن الفعالية المضادة للمستخلص تزداد بزيادة تركيزه ,و أن قيمة MIC وقيمة MBC تتفاوت اعتماداً على نوع المستخلص ونوع البكتريا كما موضح في الجدول 3

جدول(3):التركيز المثبط الادنى و التركيز القاتل الادنى لمستخلصات نبات الورد الماوي المائيه و الكحوليه المؤثر على نمو العزلات العائده لجنس *Streptococcus* , *Staphylococcus* و *Micrococcus* .

ت	العزلات البكتيرية	التركيز المائي %		التركيز الكحولي %	
		MIC	MBC	MIC	MBC
1	*Strept.pyogenes*	%60	%70	%30	%40
2	*Strept.pneumoniae*	-	-	%40	%50
3	*Strept.salivarious*	-	-	%20	%30
4	*Staph.aureus*	%40	%50	%30	%40
5	*Staph.epidermidis*	%40	%50	%10	%20
6	*Staph. haemolyticus*	-	-	%40	%50
7	*Staph.capitis*	%20	%30	%30	%40
8	*Staph. hominis*	%40	%50	%40	%50
9	*Micrococcus spp.*	%40	%50	%20	%30

- عدم وجود قيمة MIC و MBC

التأثير المهدئ و الجرعة المميتة الوسطية LD_{50} للمستخلص الكحولي والمائي لنبات الورد الماوي

أوضحت نتائج دراسه التاثير المهديء للمستخلص المائي و الكحولي ان لهذا المستخلص تاثيرات مهدئه و منشطه اعتمادا على حساب مدة نوم الفئران بالدقائق مقارنة بتاثير الماده المخدره البنتوباربيون والجدول 4 يبين هذا التفاوت بين المستخلصات و انواعها .

جدول(4): التأثير المهدئ للمستخلص المائي والكحولي للورد الماوي على الفئران المختبريه مقارنه مع عقار البنتوباربيتون.

ت	المجاميع / نوع المستخلص	الاعراض
.1	مجموعة السيطرة الغير محقونه او مجرعه .	لم يشاهد عليها أعراض جانبية واضحة و كانت الفئران بصحة جيدة ونشطة.
.2	مجموعة الفئران المحقونة بالبينتوباربيتون.	نوم عميق استمر43 دقيقه .
.3	مجموعة الفئران المجرعة بالمستخلص المائي للورد الماوي .	ظهور أعراض الخمول والنعاس لمدة قليلة 435 دقيقه أي (7ساعات و 25 دقيقه) .
.4	مجموعة الفئران المجرعة بالمستخلص المائي للورد الماوي والمحقونه بالبنتوباربيتون بعد ساعه من التجريع .	نوما عميقا استمر لمدة 48 دقيقه و 15 ثانيه .
.5	مجموعة الفئران المجرعة بالمستخلص الكحولي للورد الماوي .	لم تشاهد أعراض جانبية واضحة على هذه المجموعة .
6	مجموعة الفئران المجرعة بالمستخلص الكحولي للورد الماوي و المحقونه بالبنتوباربيتون بعد ساعة من التجريع.	نوما عميقا استمر لمدة 37 دقيقة

لم تكن التراكيز المستخدمة في الدراسة للمستخلص الكحولي والمائي ذات مفعول سمي ملحوظ بعد إعطائها عن طريق الفم حيث لم ينتج عنها أي نسبة من الهلاكات في أية مجموعة من مجاميع الحيوانات المجرعة .

المناقشه

تم اختيار نبات الورد الماوي في هذه الدراسه وذلك لوجود بعض المعلومات حول استخدامه في علاج أعراض التهاب البلعوم واللوزتين , اذ وجد ان يستعمل كمقشع وخافض للحرارة ينقي الدم، مهدئ عصبي ضد الانفعالات النفسية والعصبية (1و5). كانت هناك زيادة في وزن مستخلصه الكحولي الخام بعد تركيزه و تجفيفه و تعزى الى ان بعض المواد الاساسية المتواجدة في هذا النبات قابليه ذوبانيه في الكحول أعلى مما في الماء .

كان اكبر تاثير لهذا المستخلص على بكتريا *Strept.salivarius* و *Strept.pyogenes* إذ وصل القطر التثبيطي الى 27.0 ملمتر و 26.0 ملمتر على التوالي بينما كان تاثير مستخلصه المائي على بكتريا *Staph.hominis* و *Staph.capitis* 20.0 ملمتر لكل منهما . وقد تعزى الفعالية التثبيطية الى إحتوائه على التانينات والقلويدات وخصوصاً قلويد (Pyrrolizidine alkaloids) لان لها فعاليه قاتلة للأحياء المجهرية وذلك لقدرتها على التأثير على الحامض النووي للخلية و إنحشارها في أشرطته (18), وكذلك كان لها القدرة على تحطيم الغشاء البلازمي للخليه البكتيريه وتحطيم ما يحويه من بروتينات ودهون أو أنها قد تتداخل مع سلسلة التفاعلات الأيضية اللازمة لنمو الكائن المجهري (19). او لاحتوائه على الفلافونات التي لها القدرة على تمزيق الأغشية الخلوية عن طريق تكوين معقدات مع البروتينات الخارجية الموجودة فيها (20) , و على الفينولات التي تعمل على تثبيط الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأيضية الاساسية بتداخلها الغير متخصص مع البروتينات مما يؤدي الى مسخ البروتين و من ثم عدم قدرة البكتريا على الاستمرار (21). كما كان هناك تباين في قيم MIC و MBC ناتجة عن عوامل منها انتاج البكتريا بعض الانزيمات و تركيز العالق البكتيري و طبيعة تركيب الجدار الخلوي (11).

كما لوحظ من خلال مراقبة الفئران المحقونه بعد تجريعها بالمستخلص مع او بدون عقار البنتوباربيتون و حساب مدة النوم بالدقائق هناك تاثيرات مهدئه و اضحه للمستخلص المائي على حيوية هذه الحيوانات المجرعه تتمثل بقلة الحركه و اغماض العينين خصوصا عند غياب المؤثرات او المنبهات الخارجيه و هذا دليل على احتواء هذه المستخلص على مواد فعاله قادره على التاثير على المراكز العصبيه في الجسم مثل الفلافونيدات التي تعمل على نقصان افراز هرمون ACTH (Adrenocorticotrophic hormon) المهم للقيام بالفعاليات الحيويه و من ثم حدوث التهدئه(22).

فلذلك يمكن التوصل الى ان المستخلصات المائية تعمل على إطالة مدة النوم الذي يحدثها البنتوبا ربيتون مما يؤكد حصول حالة تآزر بين البنتوباربيتون وبعض المركبات الفعالة الموجودة في المستخلص المائي التي تكون قادرة على التأثير على المراكز العصبية وتثبيط الجهاز العصبي اللاودي لذلك استعملت كمهدئات. و عند تجريع الحيوانات بالمستخلص الكحولي لنبات الورد الماوي قلت مدة نوم الفئران و هذا ربما يعود الى قلة ذوبان المادة الفعالة المهدئه في الكحول وبالتالي يكون أقل تأثيراً او حدوث زياده في تراكيز مواد اخرى متواجدة في النباتات تعمل على ازاحة البنتوباربيتون من مستقبلاته و منعه من احداث التهدئه. و لهذا ففي الوقت الذي يبدو فيه هذا النبات مأمون للإصحاء، فإنه يمكن أن يؤثر على طريقة التخدير الملازمة لاجراء العمليات الجراحية , ولقد أدركت الجمعية الامريكية لأطباء التخدير التأثيرات المحتملة لعلاج الاعشاب وهي تقترح توقف المرضى عن تناول أي علاج من هذا النوع قبل أسبوعين من إجراء العملية وقد تكون هذه النصيحة صعبة التطبيق احيانا لان قرار إجراء العمليات في بعض الاوقات يتخذ قبل أيام قلائل من إجرائها [23] . لم نجد أي تأثير سمي يذكر من خلال أعراض ظاهره او تغيرات تشريحيه مثل النزف أو غيره بعد مراقبة الحيوانات المجرعة بهذه المستخلص, و قد أعطي المستخلص بجرع متدرجة لغاية 15 غرام /كيلو غرام و هي الجرعة المعطاة ضمن الحد ألاعلى لدرجات السمية التي ذكرها[24] Loomis, لذلك يمكن القول إن المستخلص المائي والكحولي للورد الماوي عملياً غير سام (practically non toxic).

المصادر

1. Chakravarty ,H.L.(1976). Plant wealth of Iraq , Adictionary of economic plants volume 1. Botary directorate. Ministry of Agricultuer and agrarian Reform.Baghdad .
2. القبيسي , حسان (1999) . معجم الاعشاب والنباتات الطبيه , الطبعه الرابعه , دار الكتب العلميه –بيروت – لبنان.
3. جبور , جبران ؛ ابو خليل , الشطي ؛ احمد شوكت . (1998). القانون في الطب لابن سينا , مؤسسة المعارف – طبعة روميه ايطاليا لسنة 1593 م – بيروت – لبنان.
4. الوائلي , احمد . (2003) . الادويه و صحة البدن , الطبعه الاولى , مطبعه برستش . منشورات انوار الهدى /ايران.
5. مجيد , سامي هاشم و محمود , مهند جميل . (1988) . النباتات و الاعشاب العراقيه بين الطب الشعبي و البحث العلمي . مجلس البحث العلمي , مركز بحوث علوم الحياة – قسم العقاقير و تقييم الادويه . الطبعه الاولى – المكتبه الوطنيه.

6. الزبيدي , زهير نجيب ,. بابان , هدى عبد الكريم ,. فليح , فارس كاظم . (1996) . دليل العلاج بالاعشاب الطبيه العراقيه ,. وزارة الصحه , دار الكتب و الوثائق ببغداد /شركة اب للطباعه الفنيه المحدوده .

7. Newall. A.C.; Anderson.A.L. and Phillipson,D.J .(1996). Herbal medicines, aguide for health-care professionals. London , the Pharmaceutical Press.

8. سعد الدين , شروق محمد كاظم. (1986) . الاعشاب الطبيه , تاليف ستاري , ف و جيراسيك , ف , دار الشؤون الثقافيه العامه , سلسله المائه الكتاب – الطبعة الاولى – وزارة الثقافه و الاعلام – بغدا د .

9. Cruickshank , R. ; Duguid , J.P Marmion , B.P; and Swain , R.H.A. (1975), Medical - Microbiology, 14 th.ed vol . 2; Churchill Living -stone Edinburgh London and Newyork

10. Collee, J.G.; Franser, A.G; Mmarmion, B.P. and Sinmones, A. (1996).Mackie and Maccartney practical Medical microbiology 14th. ed. Churchill Living ston, London

11. Swanston , F. S.K ; Day ,C.; Baileg , C.J. and Flatt, P.R. (1990). Traditional plant treatmants for diabetes. Studies in normal and Streptozatocin diabetic Mice Diabetologia 33; 462-464..

12. Harborn,J.B.;Mabary,T.J. and Mabary,H.(1975).Physiological and functional of flavonoids. New York , Sanfrancisco.

13. Shihata, I.M. (1951). A pharmacological study of Anagallis arvensis,MSc. Thesis faculty of Vet. medicine. Cario University.

14. Vandepitte,J.;Engback,K.;Piot,P.and Heuk ,C.(1991).Basic laboratary procedures in clinical bacteriology . World Health Organization,Geneva..

15. Atlas, R.M.; Brown, A. E and Parks, L.C. (1995). Exprimental Microbiology Laboratory manual. Mc Graw. Hill Companies Mos -by Company. St. Louis.

16. النعيمي , حنان عدنان شاكر . (2005) . تقييم فعالية بعض المستخلصات النباتيه على نمو البكتريا المرضية الموجبة الصبغة المعزولة من حالات التهاب البلعوم و اللوزتين.رسالة ماجستير مقدمة الى معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية للدراسات العليا جامعة بغداد.

17. Klaassen,C.D.;Amdar,M.O.;Doull,J.(1986).Casarett and Doulls Toxicology the basic science of poisons.3rd ed. Macmillon publishing company , NewYork.

18. Phillipson, J.D and Oneill , M.J. (1987) . Newleads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules Acta.Pharm. Nord; 1; 131-144.

19. Anthony,H.R.(1976). Chemical Microbiology. An introduction to microbial physiology. 3rd.ed. Butter- worth and Co. Ltd London.

20. Tsuchiya, H.; Sato, M.; linum, M. ; Yokoyama, J. ; Ohy ama, M.; Tanaka, T; Takasa, I .and Naimkawa, I. (1994). Inhibtion of the growth of cariogenic bacteria in vitra by plant Flavones. Expermentia 50; 846-849.
21. Mason,T.L.and Wasserman , B.P.(1987) .Inactivation of red beta Glucan Synthase by native and Oxidized phenolic compounds.Phytochemistry 26 : 2197-2202.
22. Gardiner , p. (1999) . The longwood herbal task force Chamomile (Matricaria recutita, Anthemis nobilis).
23. الدكتور شون سويون .(2001). مخاطر العلاج بالاعشاب , موسوعة البوابه , بحث في الصحه / بوابة الشرق الوسط..
24. Loomis, T.A. (1968).Essential of Toxicology. 1st.ed. Lea and Febiger ,Philadelphia.